Aus der Chirurgischen Universitäts-Klinik Tübingen

Direktor: Professor Dr. W. Dick

Untersuchungen über gerinnungsanalytisch faßbare Wechselwirkungen in heparin- und protaminhaltigen Systemen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

ROSEMARIE HINGER

aus Tübingen

1962

7184

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549608_0158

Aus der Chirurgischen Universitäts-Klinik Tübingen

Direktor: Professor Dr. W. Dick

Untersuchungen über gerinnungsanalytisch faßbare Wechselwirkungen in heparin- und protaminhaltigen Systemen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

ROSEMARIE HINGER

aus Tübingen

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dekan: Professor Dr. K. Brecht
1. Berichterstatter: Doz. Dr. P. Matis
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Dick

MEINEN ELTERN UND LEHRERN

IN DANKBARKEIT

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 5

II. Eigene Untersuchungen 8

A. Methodik 8

B. Gerinnungsanalyse 9

1. $CaCl_2$-(Rekalzifizierungs)zeit 9

a) $CaCl_2$-Heparin-Zeit 9

b) $CaCl_2$-Protamin-Zeit 9

2. Thromboplastinzeit 10

a) Thromboplastin-Heparin-Zeit 10

b) Thromboplastin-Protamin-Zeit 10

3. Thrombinzeit 14

a) Thrombinzeit bei steigenden Thrombinkonzentrationen im Ansatz . 14

b) Thrombin-Heparin-Zeit 14

c) Thrombin-Protamin-Zeit 15

4. Thrombin-Protamin-Zeit im gereinigten System 17

5. Inkubationsversuche 19

a) Reaktionszeiten im System Fibrinogen-Protaminsulfat-Heparin-Thrombin 19

b) Reaktionszeiten im System Plasma-Protaminsulfat-Heparin-Thrombokinase-$CaCl_2$ 22

6. Reaktionszeiten nach Komplexbildung 23

a) Protamin-Heparin-Komplex im System Fibrinogen-Thrombin . . 23

b) Protamin-Heparin-Komplex im Plasma 24

c) Protamin-Heparin- bzw. Protamin-Eiweiß-Komplex im Plasma . . 24

d) Protamin-Heparin- bzw. Protamin-Eiweiß-Komplex im gereinigten System Fibrinogen und Thrombin 25

7. In-vivo-(Bilanz-)Versuche 25

C. Diskussion 26

D. Zusammenfassung 32

E. Literatur 33

I. Einleitung

Man hat es im Hinblick auf die Vermeidung von Komplikationen gerinnungshemmender Maßnahmen seit jeher als besonderen Vorteil der *Heparine* betrachtet, daß ihre im Vergleich mit Dicumarol(analogen) ohnehin flüchtigere Wirkung durch einen *Antagonisten* darüber hinaus schlagartig zu unterbrechen war.*

Es war nämlich festgestellt worden, daß *Protaminsulfat* in einer bestimmten Relation in vivo und in vitro die durch *Heparin* bedingte Verlängerung der Gerinnungszeit aufhebt (2, 3), und zwar als Folge einer Komplexsalzbildung (s. hierzu 4) zwischen den sauren Heparingruppen und den basischen Protaminsulfatgruppen.

Den genannten Körperklassen kommt eine Vielfalt *biochemischer* und als deren Sonderfall *auf die Blutgerinnung* gerichteter Wirkungen zu.

Hinsichtlich der *Heparine* sei auf die klassische Abhandlung von Jorpes (5) sowie einige neuere zusammenfassende Darstellungen (6, 7) verwiesen.

Die *Protamine* sind seit den Arbeiten von Miescher und A. Kossel (8) schon über ein halbes Jahrhundert bekannt. Sie gehören zur Gruppe der einfachen, niedermolekularen Proteine und sind als *einfachste Eiweißstoffe* zu betrachten (9). Sie sind aus einer geringen Anzahl von Aminosäuren, unter denen das Arginin mengenmäßig an erster Stelle steht (10), aufgebaut, haben stark basische Eigenschaften und liefern bei hydrolytischer Spaltung nur wenige und relativ einfache Spaltungsprodukte. Das Molekulargewicht liegt bei 7000. Protamine kommen in den männlichen Geschlechtsorganen gewisser Fischarten, wie Lachs, Hering, Makrele und Stör vor. Derzeit werden Protamine aus den Testikeln von Salmarten hergestellt (s. a. S. 29).

Während die Heparine als praktisch atoxisch gelten können, erwiesen sich Protamine bei parenteraler Zufuhr als verhältnismäßig giftig (9, 11), so daß nach diesen Beobachtungen zunächst eine Anwendung beim Menschen nicht in Betracht gezogen wurde. Wichtige Symptome sind hier: Bradykardie, vertiefte Atmung und *Blutdruckabfall,* offenbar durch Einwirken auf die glatte Muskulatur der Gefäße (9), bzw. durch arterielle Dilatation (12, 13). Außerdem sollen die Protamine auf die quergestreifte Muskulatur schädigend wirken.** Für eine Herzmuskel-

---

* Bezüglich der Klinik des Thromboembolieproblems sei auf das „Kurze Handbuch der thromboembolischen Erkrankungen" (1) verwiesen. Hier ist auch die wesentliche Literatur nachgewiesen.

** Auch wir konnten den schädigenden Einfluß des Protamins auf die quergestreifte Muskulatur während unserer Versuche am Kaninchen beobachten. Wenn das Wirkungsoptimum erreicht war, wurden die Glieder der Tiere schlaff, die Muskulatur konnte weder willkürlich noch reflektorisch erregt werden. Es kam zu mehr oder weniger ausgeprägten Lähmungen, die jedoch nach Stunden bzw. Tagen wieder ganz oder teilweise zurückgingen.

schädigung durch Protamin spräche, daß der Schweregrad der Bradykardie unabhängig von dem Wechsel des Blutdrucks ist, d. h. der Blutdruck kann seinen normalen Ausgangswert schon längere Zeit wieder erreicht haben, auch wenn die Verlangsamung der Pulsfrequenz noch anhält.

Die *koagulotrope Wirkung* wurde als Antithromboplastin-Effekt (14—16), Beeinträchtigung der Thrombokinasebildung (17—18), Antiprothrombinwirkung (19), letztlich also als Hemmung der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin (20, 21), aber auch als fibrinoplastisch, fibrinogenlabilisierend (15), fibrinogenfällend (22—24), bzw. die Reaktion Fibrinogen-Thrombin beeinflussend (25, 26) gedeutet.

Bereits ein Blick auf diese Vielfalt koagulotroper, aber auch sonstiger Wirkungen von Heparinen und Protaminen (Abb. 1) zeigt, daß von einer *Komplex-*

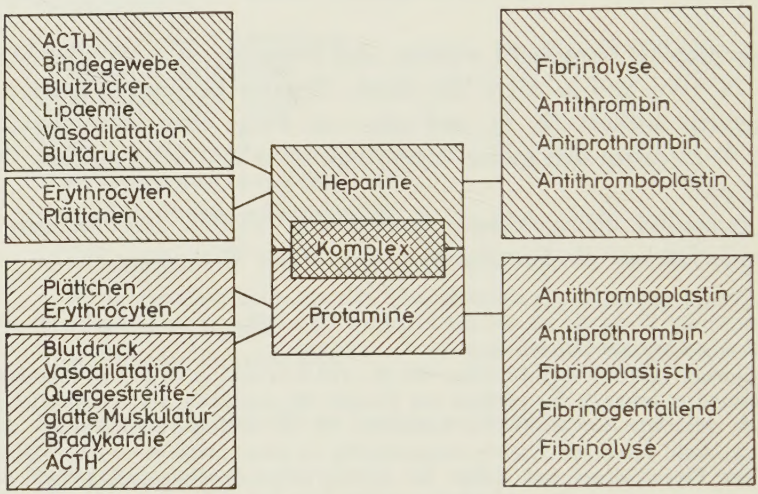


Abb. 1: Einige Wirkungen der Heparine und Protamine

bildung zwischen diesen Körpern keine Aufhebung aller Heparinwirkungen zu erwarten war. So wurde wiederholt darauf hingewiesen (27), daß z. B. gerade die durch längere Heparinverabreichung so *wichtige Beeinflussung der Plättchen* — um nur einen Effekt zu nennen — keinesfalls voll aufgehoben wird,* und nur von einer Neutralisierung einiger Komponenten der Heparinwirkung gesprochen werden könne. Umgekehrt gehen auch bestimmte Effekte des Protaminsulfates durch die Komplexbildung nicht verloren (12). Zudem muß grundsätzlich auch mit der Summation unerwünschter Effekte gerechnet werden.

---

* Die Beeinträchtigung der Plättchenfunktion durch Heparine wurde auch als Hämophilisierung der Plättchen (28) bezeichnet. Da diese so wichtige Plättchenfunktion viel nachhaltiger gestört wird als die gemeinhin gemessenen Reaktionszeiten, ist deren Erfassung, etwa über die Retraktionszeit (29) zur Kontrolle der Heparinwirkung im Hinblick auf eine Vermeidung von Kumulationseffekten (30) besonders geeignet.

Solange es sich einfach darum handelte, die Heparinwirkung im Laufe einer Antikoagulantienbehandlung prompt zu unterbrechen — unter Beachtung einiger weniger ad hoc festgelegter Faustregeln — blieben alle jene Probleme im Hintergrund, die sich etwa aus den besonderen Gegebenheiten des extrakorporalen Kreislaufes ergaben (z. B. 31—33). Die bis dahin bewährten Richtlinien versagten, Nachblutungen — um nur von dieser Komplikation der Heparinwirkung zu sprechen — trotz nach den bisherigen Vorstellungen ausreichender und gerinnungsanalytisch auch belegter Neutralisierung des zugeführten Heparins, mußten zu denken geben.

Die *Ermittlung der Dosierungserfordernisse* sowohl für Heparin zur Ungerinnbarmachung des Blutes, als auch von Protaminsulfat zur Neutralisierung des inkorporierten Heparins wurde zu einem wichtigen Problem. Das gleiche gilt für die *Kontrolle* der von einem bestimmten Zeitpunkt an so wichtigen Neutralisierung des Heparineffektes durch Protaminsulfat.

Mir war die Aufgabe gestellt worden, Untersuchungen über die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen in diesem Zusammenhang wichtigen Reaktionsteilnehmern anzustellen.

Sie sollten unter Außerachtlassung der Pathogenese und des Erscheinungsbildes der Gerinnungsstörungen, wie sie dem extrakorporalen Kreislauf an sich eigen sind [s. hierzu (33)], erfolgen.

II. Eigene Untersuchungen

A. Methodik

Die Untersuchungen wurden grundsätzlich im silikonisierten System bei 37° C durchgeführt. Die Versuchsanordnung wurde so getroffen, daß unvermeidbare Einflüsse, wie Alterung des Plasmas, einer Thrombinlösung und dgl. sich auf die zu ermittelnden Reaktionszeiten in gleicher Weise auswirken. Die Untersuchungen wurden in einigen Ansätzen mit Zitratblut, in der Regel mit Zitratplasma durchgeführt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich, soweit nicht ausdrücklich vermerkt, jeweils auf γ/ccm Reagenz. Bezüglich methodischer Einzelheiten sei auf die Zusammenstellung von Jürgens und Beller (34), im übrigen aber auf die jeweils in den Tabellen und Abbildungen angegebenen Versuchsansätze verwiesen.

Inkubationsversuche wurden nach 30 Minuten währender Inkubation bestimmter Reaktionsteilnehmer bei 37° C durchgeführt. Die gleichen Reaktionsteilnehmer wurden in parallel laufenden korrespondierenden Ansätzen — unter sonst gleichen Bedingungen, aber nicht inkubiert — untersucht. Die Bestimmungen im Versuchs- und Kontrollansatz wurden, um eine Voraussetzung für eine volle Vergleichbarkeit zu schaffen, alternierend durchgeführt.

Eine *statistische Auswertung der Versuchsergebnisse* war nur dort sinnvoll, wo Reaktionszeiten in genügender Anzahl (mindestens 8 Bestimmungen) alternierend unter vergleichbaren Bedingungen ermittelt werden konnten, und damit auf die Inkubationsversuche zu beschränken:

Bei der Signifikanzprüfung* wurde eine Normal-, t-, Poisson- und Binomialverteilung (Berücksichtigung der kleinen Zahl) zugrunde gelegt. Die Parameter der Verteilung wurden auf Grund der Beobachtungsgruppen abgeschätzt und (besonders hinsichtlich der Streuung) kumuliert, soweit dies zulässig war. Die Parameter der Verteilung der Mittelwerte wurden ermittelt. Die zu vergleichenden Mittelwerte wurden auf Zutreffen der Arbeitshypothese „gleich" geprüft. Die Hypothese „gleich" wurde, soweit zufällige Einflüsse auszuschalten sind, verworfen, sobald die Restwahrscheinlichkeit kleiner als 5% ausgewiesen wurde. Diese Mittelwerte sind mit (*) gekennzeichnet.

Zur Nomenklatur: Die Reaktionszeiten waren unter konsequenter Durchführung dieses Prinzips nach dem zugeführten Reagenz zu bezeichnen, z. B.: Thrombinzeit, Thromboplastinzeit. Demnach ist die Bestimmung der *Thrombinzeit* unter steigenden Gaben von *Protaminsulfat* als Thrombin-Protamin-Zeit zu bezeichnen, wobei das die Gerinnung auslösende Agens (in diesem Falle Thrombin) an erster Stelle steht (Matis). Wird hingegen im Tierversuch die Thrombinzeit eines infolge vorhergehender Injektion heparinhaltigen Plasmas bestimmt, kann nur von Thrombinzeit eines heparinhaltigen Plasmas gesprochen werden [s. hierzu auch (35)].

---

* Hier speziell benutzte Literatur: A. Hald: Statistical Theory with Engineering Applications. J. Wiley & Sons, 2. Auflage, New York 1955. Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung danke ich Herrn Dipl.-Math. H. Matis.

Reagenzien:

Kalziumchlorid m/40
Thromboplastinlösung Roche
Protaminsulfat (Salmin) Roche 1%ige Lösung
Heparin: Liquemin Roche, 5000 E/ccm
Thrombin Roche
Fibrinogen Behring-Werke. Die Lösung wurde jeweils auf 600 mg% eingestellt.
Plasma: Zitratblut 9 : 1. 15 Min. bei 3000 U zentrifugiert
Albuminlösung 2%ig
Gamma-Globulinlösung 2%ig
Puffer: Michaelispuffer pH 7,25.

B. Gerinnungsanalysen

1. $CaCl_2$-Rekalzifizierungs)zeit

a) $CaCl_2$-Heparin-Zeit:

Mit zunehmender Heparinkonzentration kommt es zu der bekannten Verlängerung der Reaktionszeit (Tab. 1). Diese Verlängerung ist ganz wesentlich abhängig von der Thrombozytenzahl (36), aber auch einer Vielfalt anderer Faktoren, die im einzelnen nicht immer zu identifizieren sind.

Tab. 1: Verlängerung der $CaCl_2$-Heparin-Zeit eines Leerplasmas (*1*), eines Plasmas nach Injektion von 1 mg/kg Heparin (*2*) sowie nach unmittelbar anschließender zusätzlicher Injektion von 2 mg Protamin/kg (*3*). Durchschnittswerte von 3 Hunden

0,2 Heparin — $CaCl_2$	0	0,1 E	0,2 E	0,3 E	0,4 E	0,5 E/ccm
0,2 Plasma						
Reaktionszeit (Sek.) unter Verwendung von Leerplasma (*1*)	132	156	179	209	243	308
Plasma nach Injektion von 1 mg/kg Heparin (*2*)	520	661	771	951	1124	1323
Plasma nach zusätzl. Injektion von 2 mg Protamin/kg Körpergewicht (*3*)	156	169	206	309	369	534

b) $CaCl_2$-Protamin-Zeit:

Mit zunehmender Protaminkonzentration kommt es zu einer Verlängerung der Reaktionszeiten (Tab. 2):

Tab. 2: Steigende Konzentrationen von Protaminsulfat führen zu zunehmender Verlängerung der $CaCl_2$-Zeit ($CaCl_2$-Protamin-Zeit)

0,2 Plasma					
0,2 Protamin	0	12,5 γ	25 γ	50 γ	100 γ
0,2 $CaCl_2$					
Reaktionszeit (Sek.) (*4*)	171	173	217	238	266
3 verschiedener Plasmen (*5*)	106	150	155		194
(*6*)	112,5	158	165		206
Thrombin statt $CaCl_2$ (*6a*)	26,5	26	25	24	22,5

2. Thromboplastinzeit

a) Thromboplastin-Heparin-Zeit:

Wie Abb. 2 und Tab. 3 zeigen, bewirkt Heparinzusatz eine Verlängerung der Reaktionszeit. Am ausgeprägtesten in heparinhaltigem (*9*), am wenigsten in protaminhaltigem (*8*) Plasma.

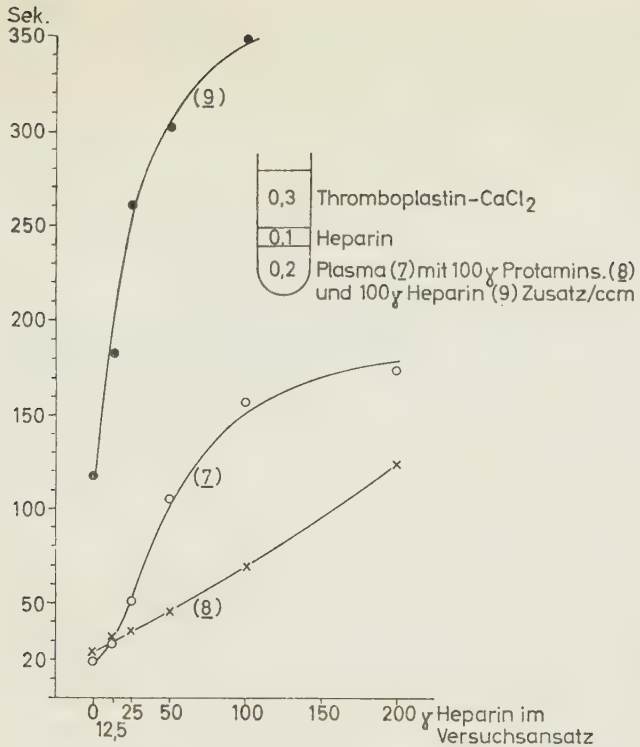
Dieselben Verhältnisse zeigen sich bei Bestimmung der Thromboplastin-Heparin-Zeit nach Heparinbelastung des Versuchstieres (Kaninchen). Hier kommt es verständlicherweise zu einer erheblichen Verlängerung der Reaktionszeit gegenüber dem unbelasteten Tier. Wird dem heparinisierten Tier Protaminsulfat injiziert und so die Heparinwirkung in vivo neutralisiert, so entsprechen die Thromboplastin-Heparin-Zeiten etwa den im Leerblut gemessenen (Tab. 4).

b) Thromboplastin-Protamin-Zeit:

Mit zunehmender Protaminkonzentration kommt es zur Verlängerung der Reaktionszeit im Leerblut und etwas ausgeprägter im protaminisierten Blut.

Tab. 3: Meßwerte zu Abb. 2

0,3 Thrombokinase $CaCl_2$						
0,1 Heparin	0	12,5 γ	25 γ	50 γ	100 γ	200 γ
0,2 Plasma						
Reaktionszeit (Sek.)						
1. im Leerplasma (*7*)	21″	29″	53″	107″	157″	176″
2. mit 100 γ/ccm Protaminsulfat (*8*)	25″	31″	37″	44″	70″	126″
3. mit 100 γ/ccm Heparin im Plasma (*9*)	119″	183″	261″	305″	360″	376″



A b b. 2 : Typisches Verhalten der Thromboplastin-Heparin-Zeit. Diese ist am meisten im heparinhaltigen (*9*), am wenigsten im protaminhaltigen (*8*) Plasma ausgeprägt (gesunde Versuchsperson)

T a b. 4 : Verlängerung der Thromboplastin-Heparin-Zeit beim unbehandelten Tier (*10*) nach Heparininjektion (*11*) und der Heparininjektion unmittelbar folgender Protamininjektion (*12*). Übereinstimmung der Werte unter (*10*) und (*12*)

0,3 Thrombokinase $CaCl_2$					
0,1 Heparin	0	50 γ	100 γ	200 γ	400 γ
0,2 Plasma					
Reaktionszeit (Sek.) vor Injektion (*10*)	10	48	65	145	210
5 Min. nach Injektion von 1 mg/kg Heparin (*11*)	12	56	98	240	322
5 Min. nach Injektion von 2 mg/kg Protaminsulfat (*12*)	9,5	45	69	149	214

Im heparinhaltigen Blut registriert man zunächst eine Verkürzung, und erst nach Neutralisierung des Heparins durch die zugeführten Reagenzien eine Verlängerung (Abb. 3 und Tab. 5).

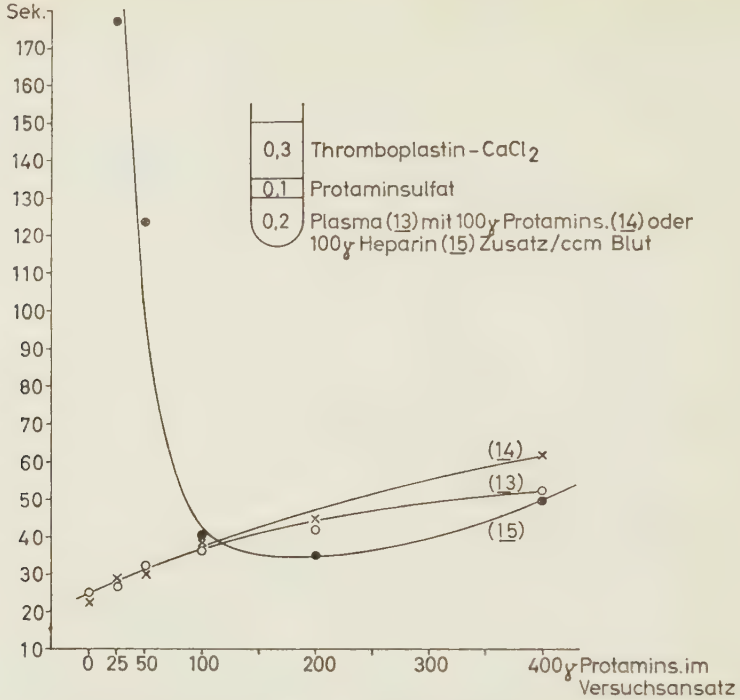


Abb. 3: Typisches Verhalten der Thromboplastin-Protamin-Zeit. Die Verlängerung der Reaktionszeit ist im protaminhaltigen Plasma (*14*) ausgeprägter als im protaminfreien Plasma (*13*). Nach Neutralisation des Blutheparins in vitro beobachtet man ebenfalls eine Verlängerung der Thromboplastinzeit (*15*). Durchschnittswerte aus 3 Versuchen unter Verwendung des Blutes klinisch gesunder Versuchspersonen

Tab. 5: Meßwerte zu Abb. 3

0,3 Thrombokinase $CaCl_2$						
0,1 Protaminsulfat	0	25 γ	50 γ	100 γ	200 γ	400 γ
0,2 Blutplasma						
Reaktionszeit (Sek.) mit Leerblut (*13*)	25″	27″	32″	37″	42″	52″
mit 100 γ Protaminsulfat ccm Blut (*14*)	23″	28″	32″	38″	45″	61″
mit 100 γ Heparin/ccm Blut (*15*)	261	177	124	40	35	50

Dieselben Verhältnisse ergeben sich bei Bestimmung der Thromboplastin-Protamin-Zeit, wenn vor der Blutentnahme eine bestimmte Menge Heparin *injiziert* worden war: Mit steigender Protaminkonzentration kommt es zunächst zu einer Verkürzung der Reaktionszeit, wobei der Kurvenverlauf von der injizierten Heparinmenge abhängt.

Wird die Heparinwirkung durch eine Protaminsulfat-Injektion vor der Blutentnahme aufgehoben [Tab. 6, (*18*)], so wirkt der Protaminzusatz in vitro nicht anders als bei nicht vorbehandelten Tieren.

Tab. 6 : Verhalten der Thromboplastin-Protamin-Zeit beim unbehandelten Tier (*16*), im Anschluß an eine Heparininjektion (*17*) und nach anschließender Protamininjektion (*18*). Gute Übereinstimmung der Reaktionszeiten unter (*16*) und (*18*) im protaminsulfatfreien Ansatz; ab 50 γ Protaminsulfat auch in allen drei Reihen. (Durchschnittswerte 4 Hunde, die 1,5 mg/kg Körpergewicht Heparin und anschließend 4 mg/kg Körpergewicht Protaminsulfat erhalten hatten.)

0,3 Thrombokinase $CaCl_2$					
0,1 Protaminsulfat	0	50 γ	100 γ	200 γ	400 γ
0,2 Blut					
Reaktionszeit (Sek.) vor Injektion (*16*)	10,6	14,3	16,3	19	29,5
nach Injektion von 1,5 mg/kg Heparin (*17*)	16,6	14	14,6	20	30,3
nach zusätzlicher Injektion von 4 mg/kg Protaminsulfat (*18*)	10,8	15	15,6	19,8	29,8

Tab. 7 a und b : Unterschiedliche Thromboplastin-Protamin-Zeiten im Leerblut (*19*) und (*22*). Hierzu divergentes Verhalten unter (*21*) und (*24*)

0,3 Thrombokinase $CaCl_2$					
0,1 Protaminsulfat	0	50 γ	100 γ	200 γ	400 γ
0,2 Blut					
Reaktionszeit (Sek.) vor Injektion (*19*)	11	14	15	16	23
nach Injektion von 1 mg/kg Heparin (*20*)	14	15	15	18	30
nach zusätzlicher Injektion von 3 mg/kg Protaminsulfat (*21*)	11	16	17	21	38
Reaktionszeit (Sek.) vor Injektion (*22*)	11	15	16	18	33
nach Injektion von 1 mg/kg Heparin (*23*)	13	15	17	22	34
nach zusätzlicher Injektion von 3 mg/kg Protaminsulfat (*24*)	11	15	16	20	31

Im Leerblut steigen die Reaktionszeiten mit zunehmender Protaminkonzentration an.

Daß hier deutliche Unterschiede bestehen können, zeigt Tab. 7a und b.

3. Thrombinzeit

a) Thrombinzeit bei steigenden Thrombinkonzentrationen im Ansatz:

Die Thrombinzeit eines *Plasmas* nimmt mit steigender Thrombinkonzentration ab. Dasselbe gilt für ein heparinhaltiges Plasma (Tab. 8).

Tab. 8: Mit zunehmender Thrombinkonzentration Abnahme der Reaktionszeit (*25*). Dies gilt auch bei gleichbleibenden Heparinkonzentrationen im Versuchsansatz (*26*). Mittelwerte aus 6 Versuchen

0,2 Thrombin	5 E	10 E	20 E	40 E im Ansatz
0,2 Plasma				
Reaktionszeit (Sek.) heparinfreies Plasma (*25*)	16,6	10,6	8,1	6,1
heparinhaltiges Plasma (*26*)	200,5	28	15,1	7,8

b) Thrombin-Heparin-Zeit:

Die Reaktionszeit nimmt mit steigender Heparinkonzentration zu. Das Ausmaß der Verlängerung wird naturgemäß von der Thrombinkonzentration mitbestimmt (Tab. 9).

Tab. 9: Steigende Heparinkonzentrationen führen bei jeweils gleichbleibender Thrombinkonzentration zur Verlängerung der Reaktionszeiten

0,2 Thrombinlösung	verschiedener Konzentrationen				
0,2 Plasma mit	0	5 γ	10 γ	20 γ	30 γ/ccm Heparin*
Reaktionszeit (Sek.) mit 5 E Thrombin/ccm (*27*)	19	39	92	249	373
10 E Thrombin/ccm (*28*)	14	28	48	57	66
20 E Thrombin/ccm (*29*)	10	16	24	36	42
40 E Thrombin/ccm (*30*)	8	7	8	10	17

* Es ist für die Nomenklatur hierbei gleichgültig, ob Heparin mit dem Plasma, oder separat dem Gerinnungsgemisch beigegeben wird.

Hierbei entsprechen einander, nach Tabelle 10 angenähert folgende Thrombinzeiten:

Tab. 10: Heparin-Thrombin-Äquivalente der in Tab. 9 ermittelten Reaktionszeiten *(27)—(30)*

5 Gamma Heparin	+ 20 E Thrombin
30 Gamma Heparin	+ 40 E Thrombin
oder	
5 Gamma Heparin	+ 5 E Thrombin
20 Gamma Heparin	+ 20 E Thrombin
oder	
10 Gamma Heparin	+ 10 E Thrombin
30 Gamma Heparin	+ 20 E Thrombin

c) Thrombin-Protamin-Zeit:

Mit steigender Protaminkonzentration nimmt die Reaktionszeit im Blut bzw. Plasma ab. Dasselbe gilt für heparinhaltiges Plasma und auch für protaminhaltiges Plasma (Tab. 11).

Tab. 11: Protamin-Thrombin-Zeit im Plasma: Sowohl im heparinfreien als auch im heparin- bzw. protaminhaltigen Blut (Plasma) kommt es mit zunehmender Protaminkonzentration zu einer Verkürzung der Reaktionszeiten. Der starke Abfall im heparinhaltigen Blut (*32*) ist zunächst durch Neutralisation des Heparins bedingt.

0,2 Thrombinlösung	5 E/ccm				
0,1 Protaminsulfat	0	20 γ	40 γ	80 γ	200 γ/ccm
0,2 Blut					
Reaktionszeit (Sek.) (*31*)	17	15	15	14,5	14,0
Reaktionszeit unter Verwendung von Blut mit 40 γ Heparin/ccm (*32*)	333	55	25	21	17
Reaktionszeit unter Verwendung von Blut mit 20 γ/ccm Protaminsulfat (*33*)	16	15	14	14	

Abb. 4 und Tab. 12 zeigen die Thrombin-Protamin-Zeiten eines heparinhaltigen Plasmas für 4 verschiedene Thrombinkonzentrationen.

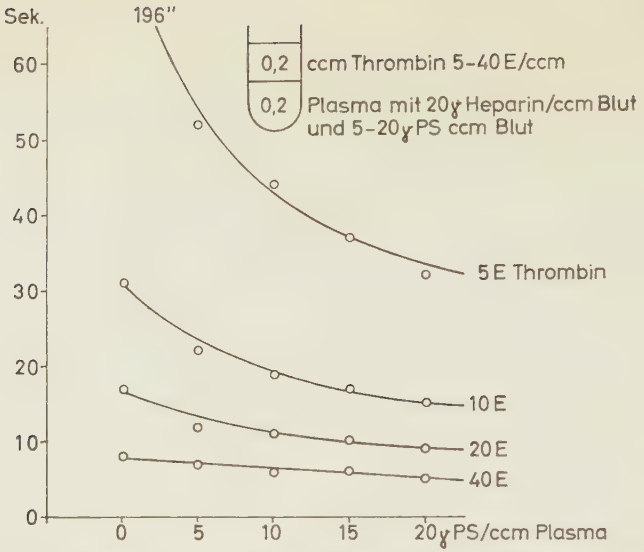


Abb. 4: Thrombin-Protamin-Zeit in einem Plasma gleichen Heparingehaltes (Durchschnitt aus 4 Versuchen). Da hier, wie aus dem Versuchsansatz der Tab. 12 hervorgeht, Protaminsulfat mit dem Heparin im Plasma inkubiert ist und Thrombin erst später hinzutritt, handelt es sich streng genommen um eine Einwirkung von Thrombin auf einen Heparin-Protaminsulfat-Komplex. Dieser Versuch ahmt den Tatbestand, den man in vivo antrifft, nach: Es wird eine bestimmte Heparinkonzentration durch Protaminsulfat in verschiedenem Umfang neutralisiert und dann die Thrombinzeit bestimmt

Tab. 12: Meßwerte zu Abb. 4.

0,2 Thrombinlösung	5—40 E/ccm				
0,2 Plasma	mit 20 γ Heparin/ccm Blut und Protaminsulfat/ccm				
	0	5 γ	10 γ	15 γ	20 γ
Reaktionszeit (Sek.) 5 E Thrombin (*34*)	190	52	44	37	32
10 E Thrombin (*35*)	31	22	19	17	15
20 E Thrombin (*36*)	17	12	11	10	9
40 E Thrombin (*37*)	8	7	6	6	5

Thrombin und Protaminsulfat können sich bei der Verkürzung der durch Heparin verlängerten Reaktionszeit ersetzen. Abb. 5 zeigt, daß das „Gewicht" des Protaminsulfats von der Thrombinmenge abhängt: Je größer die Thrombinmenge desto größer die Wirkung des Protamins.

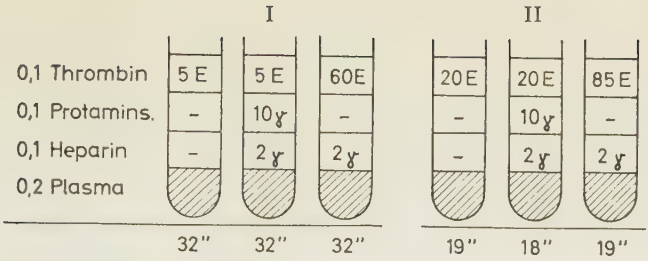


Abb. 5 : Im Ansatz I ersetzen 10 Gamma Protaminsulfat 55 E Thrombin, im Ansatz II dagegen 65 E Thrombin

4. Thrombin-Protamin-Zeit im gereinigten System

Die folgenden Untersuchungen erstrecken sich auf das Verhalten der Reaktionszeit im System Thrombin-Fibrinogen-Protaminsulfat.

a) Im System Fibrinogen-Thrombin-Protaminsulfat kommt es mit steigender *Protaminkonzentration* entsprechend einer Verstärkung der Thrombinwirkung zur Verkürzung der Reaktionszeiten (Tab. 13).

Tab. 13 : Thrombin-Protamin-Zeit unter steigender Protaminkonzentration

0,1 Thrombin					
0,1 Protaminsulfat	0	12,5 γ	25 γ	50 γ	100 γ/ccm
0,1 Fibrinogen					
Reaktionszeit (Sek.) mit Thrombinlösung in $CaCl_2$ gelöst (*38*)	19	19	17,5	16	15
mit Thrombinlösung in Aqua dest. gelöst (*39*)	21	19	17	16	15,5

b) Die Verkürzung der Reaktionszeit durch Protaminsulfat in Abhängigkeit von der *Thrombinkonzentration* geht aus Tab. 14 hervor:

Tab. 14: Thrombin-Protamin-Zeit (steigende Protaminmenge) bei verschiedenen Thrombinkonzentrationen.

0,2 Thrombinlösung	verschieden konzentriert				
0,2 Protaminsulfat	0	12,5 γ	25 γ	50 γ	100 γ/ccm
0,2 Fibrinogen					
Reaktionszeit (Sek.) mit Thrombinlösung 5 E/ccm (*40*)	17	14	16	16	19
Thrombinlösung 1 E/ccm (*41*)	45	39	42	45	48
Thrombinlösung 0,5 E/ccm (*42*)	67	66	69	76	83
Thrombinlösung 0,2 E/ccm (*43*)	167	167	187	192	208
Thrombinlösung 0,1 E/ccm (*44*)	207	210	251	263	274

c) Die Beeinflussung der Reaktionszeit durch $CaCl_2$ geht aus Tab. 15a und b hervor:

Tab. 15a und b: Die in Anwesenheit von $CaCl_2$ ermittelten Reaktionszeiten sind sowohl bei hohen als auch niedrigen Thrombinkonzentrationen kürzer

0,2 Fibrinogen					
0,2 NaCl/$CaCl_2$					
0,1 Thrombinlösung 10 E/ccm					
0,1 Protaminsulfat	0	12,5 γ	25 γ	100 γ	400 γ/ccm
Reaktionszeit (Sek.) mit physiolog. NaCl-Lösung im Ansatz (*45*)	19	16	16	16,5	18
mit $CaCl_2$ m/40 im Ansatz (*46*)	12	12	12	13,5	16

Tab. 15a

0,1 Fibrinogen					
0,2 NaCl/$CaCl_2$					
0,1 Thrombin 0,5 E/ccm					
0,1 Protaminsulfat	0	12,5 γ	25 γ	100 γ	400 γ/ccm
Reaktionszeit (Sek.) mit physiol. NaCl-Lösung im Ansatz (*47*)	194	205	210	229	265
mit $CaCl_2$ m/40 im Ansatz (*48*)	111	118	145	175	229

Tab. 15b

d) Die Verkürzung der Reaktionszeit bei verschiedenen *Fibrinogen*konzentrationen erhellt aus Tab. 16:

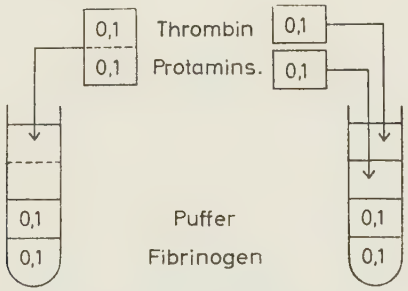
Tab. 16: Gleichsinnige Verkürzung der Reaktionszeit unter (*49*)—(*51*)

0,2 Thrombin						
0,2 Fibrinogenlösung	verschieden konzentriert					
0,2 Protaminsulfat	0	12,5 γ	25 γ	50 γ	100 γ	200 γ/ccm
Reaktionszeit (Sek.) unter Verwendung einer Fibrinogenlösung 1000 mg% (*49*)	25	25,5	24	23	19	14
Fibrinogenlösung 500 mg% (*50*)	26	23,5	22	19	18	16
Fibrinogenlösung 250 mg% (*51*)	28	25	23	21	19	18

5. Inkubationsversuche

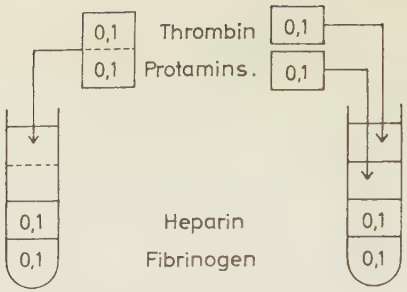
a) Reaktionszeiten im System Fibrinogen-Protaminsulfat-Heparin-Thrombin.

a1) Die Reaktionszeit im System Fibrinogen-Protaminsulfat-Thrombin (Abb. 6) bzw. Fibrinogen-Protaminsulfat-Heparin-Thrombin (Abb. 7) verhält sich verschieden, je nachdem das *Thrombin* vor seiner Zugabe zum Reaktionsgemisch *mit Protaminsulfat inkubiert* worden war oder nicht.



(52)a	26,1*	28,3*
(52)b	22,0	23,1

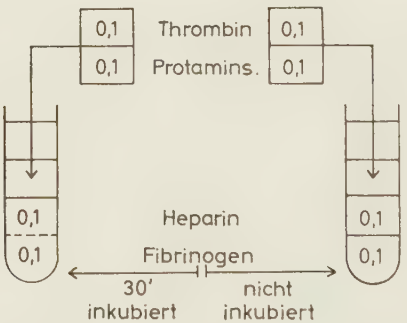
Abb. 6: Wird Thrombin mit Protaminsulfat (a = 12,5 γ/ccm, b = 50 γ/ccm) während 30 Min. bei 37° C inkubiert, ergibt sich eine kürzere Reaktionszeit *(Thrombin-Protaminzeit)* als wenn diese Reaktionsteilnehmer für sich einer Fibrinogenlösung zugegeben werden (*52a* und *b*). Um Vergleichbarkeit mit dem Versuchsansatz der Abb. 7 zuzulassen, befindet sich im Reaktionsgemisch noch 0,1 ccm Pufferlösung



(53)a	55,2*	63,1*
(53)b	46,0*	50,4*

Abb. 7: Wird Thrombin mit Protaminsulfat (a = 12,5 γ/ccm, b = 50 γ/ccm) während 30 Min. bei 37° C inkubiert, ergibt sich eine kürzere Reaktionszeit *(Thrombin-Protamin-Zeit)*, als wenn diese Reaktionsteilnehmer für sich ohne Inkubation einer Fibrinogen-Heparin-Lösung zugegeben werden (Reihe *53a* und *b*)

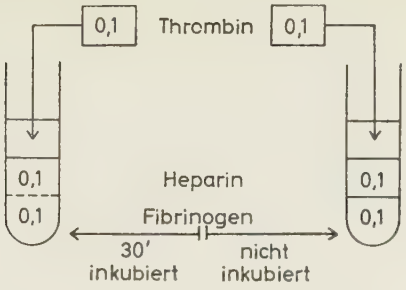
a2) Die Reaktionszeit im System Fibrinogen-Protaminsulfat-Heparin-Thrombin (Abb. 8) verhält sich verschieden, je nachdem das *Fibrinogen* vor Zugabe des Thrombin-Protaminsulfat-Gemisches *mit Heparin inkubiert* worden war oder nicht.



(54)a	33,3*	28,9*
(54)b	20,1	19,2

Abb. 8: Wird Fibrinogen mit Heparin während 30 Min. bei 37° C inkubiert, ergibt sich eine kürzere Reaktionszeit (Thrombin-Protamin-Zeit) auf Zugabe eines nicht inkubierten Thrombin-Protaminsulfat-Gemisches (a = 12,5 γ/ccm Protaminsulfat, b = 50 γ/ccm Protaminsulfat), als wenn Fibrinogen und Heparin nicht inkubiert worden wären (*54a* und *b*)

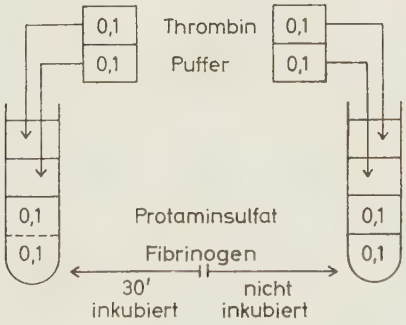
Die Verhältnisse im System Fibrinogen-Heparin-Thrombin sind aus Abb. 9 ersichtlich:



(55)a	35,0	39,5
(55)b	39,3*	36,1*

Abb. 9: Wird Fibrinogen mit Heparin während 30 (*a*) bzw. 100 Min. (*b*) bei 37° C inkubiert, ergibt sich eine längere Reaktionszeit auf Zugabe von Thrombin, als wenn Fibrinogen nicht mit Heparin inkubiert worden wäre (*55a* und *b*)

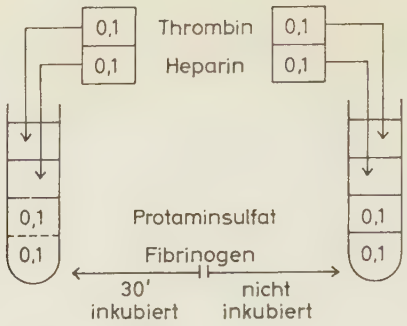
a3) Die Reaktionszeit im System Fibrinogen-Protaminsulfat-Thrombin (Abb. 10) verhält sich verschieden, je nachdem *Fibrinogen* vor Zugabe des Thrombins *mit Protaminsulfat* inkubiert worden war.



(56)a	17,5	18,4
(56)b	21,0*	17,9*

Abb. 10: Wird Protaminsulfat mit Fibrinogen während 30 Min. inkubiert, so ergibt sich eine kürzere Reaktionszeit auf Zugabe von Thrombin, als wenn Fibrinogen nicht mit Protaminsulfat inkubiert worden war (*56a* = 12,5 γ Protaminsulfat im Versuchsansatz). Bei 50 γ Protaminsulfat im Versuchsansatz (*56b*) ist es umgekehrt

Die Verhältnisse nach Einführen von Heparin in dieses System ergeben sich aus Abb. 11:

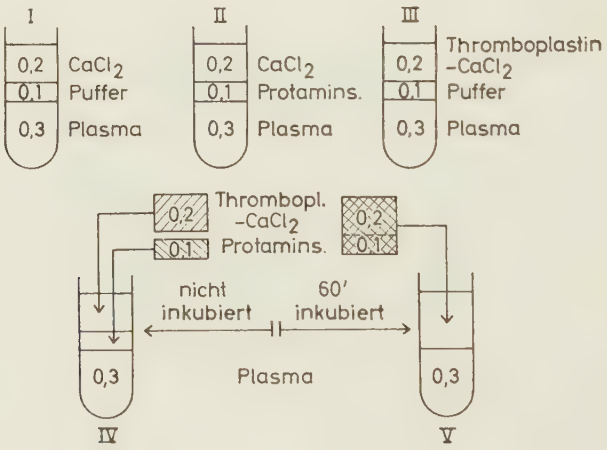


(57) 33,5 32

A b b. 1 1 : Wird Protaminsulfat (12,5 γ/ccm) mit Fibrinogen während 30 Min. inkubiert, so registriert man eine längere Reaktionszeit, als wenn das Fibrinogen mit Protaminsulfat nicht inkubiert worden war (57)

b) Reaktionszeiten im System Plasma-Protaminsulfat-Heparin-Thrombokinase-$CaCl_2$.

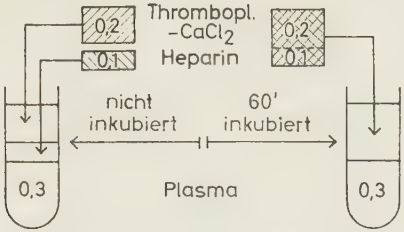
b1) Die Reaktionszeit im System Plasma-Protaminsulfat-Thromboplastin und $CaCl_2$ verhält sich praktisch gleich, ohne Rücksicht darauf, ob das Thrombokinase-$CaCl_2$-Gemisch mit Protaminsulfat inkubiert worden war oder nicht (Versuchsansatz IV und V der Abb. 12).



(58) 28″ 30″

A b b. 1 2 : Annähernd gleiche Reaktionszeiten (Thromboplastin-Protamin-Zeit) mit den inkubierten (Versuchsansatz V) und nicht inkubierten (Versuchsansatz IV) Reaktionsteilnehmern (58)

b2) Die Reaktionszeiten im System Plasma-Heparin-Thromboplastin-$CaCl_2$ verhalten sich praktisch gleich, ohne Rücksicht darauf, ob das Thromboplastin-$CaCl_2$-Gemisch mit Heparin inkubiert worden war oder nicht (Abb. 13):



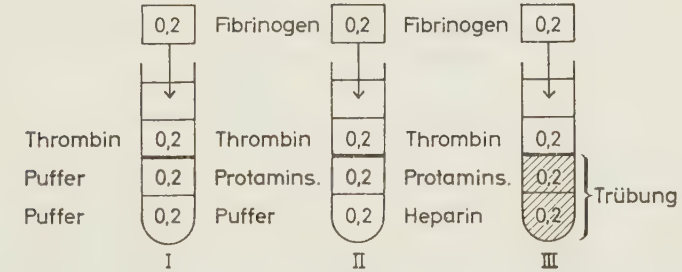
(*59*) 67,6 66,1

Abb. 13: Die Reaktionszeiten im System Plasma-Heparin-Thromboplastin-$CaCl_2$ (Thromboplastin-Heparin-Zeit) entsprechen sich, einerlei ob die beiden Reaktionsteilnehmer inkubiert worden waren oder nicht (*59*)

6. Reaktionszeiten nach Komplexbildung

a) Protamin-Heparin-Komplex im System Fibrinogen-Thrombin:

Die Reaktionszeiten im System Protamin-Heparin-Thrombin nach Möglichkeit wechselseitiger Beeinflussung dieser Reaktionsteilnehmer auf Zugabe von Fibrinogen gehen aus Abb. 14 hervor.



(*60*) 22,0 16,1 21,8

(*61*) 25,3* 18 21,9*

Abb. 14: Im Ansatz III reagieren 12,5 γ Heparin und 60 γ Protaminsulfat mit Komplexbildung (Trübung). Nach 2 Min. Zugabe von Thrombin und nach weiteren 2 Min. Zugabe von Fibrinogen. In den Ansätzen I und II analoges Vorgehen. Gleiche Reaktionszeiten (Fibrinogenzeiten) im Ansatz I und III (*60*). Bei dreifacher Inkubationszeit im Ansatz III kürzere Werte gegenüber Ansatz I (*61*)

b) Protamin-Heparin-Komplex im Plasma:

Es ist ohne Belang, ob bei Analysen in diesem System dem Plasma zuerst Protamin oder Heparin zugefügt wird, sofern Inkubationseffekte über 60 Sek. vermieden werden (Abb. 15):

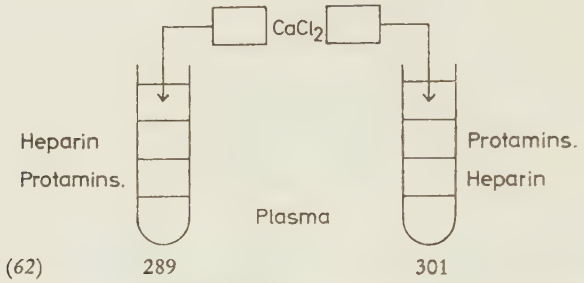


Abb. 15: Rekalzifizierungszeit nach Einpipettieren von Plasma, Protaminsulfat und Heparin im Abstand von jeweils 60 Sek. Die Reaktionszeiten (*62*) entsprechen sich

c) Protamin-Heparin- bzw. Protamin-Eiweiß-Komplex im Plasma:

Zur Prüfung dieser Frage, insbesondere ob es zur Dissoziation eines Komplexes kommt, wurde die in Abb. 16 gezeigte Versuchsanordnung gewählt.

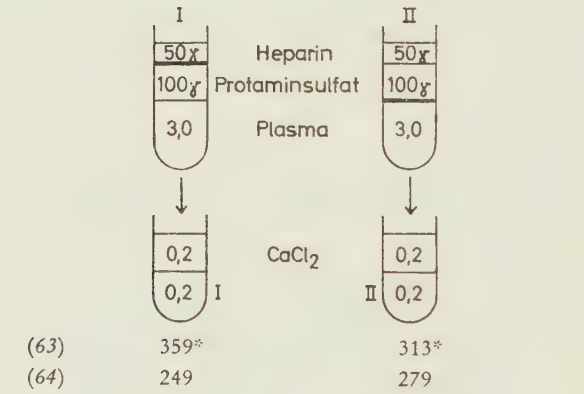


Abb. 16: Im Versuchsansatz I werden 3,0 ccm Plasma mit 100 γ Protaminsulfat versetzt, 3mal gekippt und 1 Stunde stehen gelassen. Nach 1 Stunde Einbringung von 50 γ Heparin, 3mal kippen, 1 Min. stehen lassen. Dem Plasma des Versuchsansatzes II werden nach 1 Stunde 100 γ Protaminsulfat zugesetzt, 3mal gekippt und gleich anschließend 50 γ Heparin zugefügt und 3mal kippen, 1 Min. stehen lassen. Anschließend werden den beiden Versuchsansätzen I und II alternierend jeweils 0,2 ccm entnommen und 0,2 ccm $CaCl_2$ zugeführt, d. h. die Kalziumchlorid-(Heparin-)Zeit bestimmt. Die Reaktionszeiten in Ansatz II sind kürzer (Reihe *63*; Durchschnittswerte aus je 8 Bestimmungen). Nach 120 Min. ist das Verhältnis umgekehrt: Die Reaktionszeiten in Ansatz I sind kürzer (Reihe *64*; Durchschnitt aus je 8 Bestimmungen)

d) Protamin-Heparin- bzw. Protamin-Eiweiß-Komplex im gereinigten System Fibrinogen und Thrombin:

Zur Prüfung der Frage, ob in diesem System eine bestimmte Affinität des Protamins zu einem Reaktionsteilnehmer besteht, wurde die Versuchsanordnung der Abb. 17 gewählt: Die Heparin neutralisierende bzw. Thrombin aktivierende Wirkung des Protaminsulfats nimmt im System Albumin-Fibrinogen nach einiger Zeit zu, nicht hingegen im System Globulin-Fibrinogen.

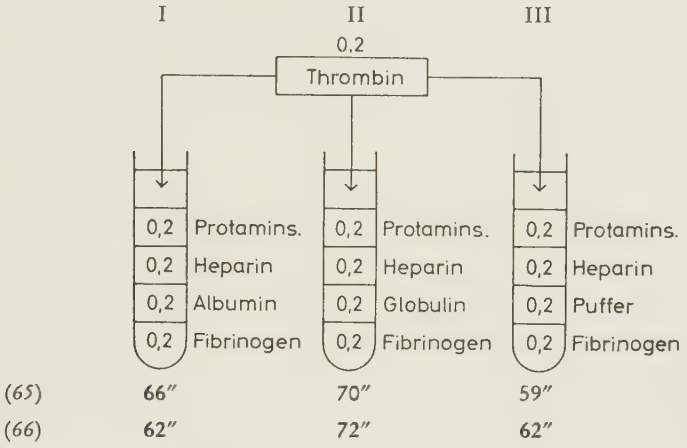


Abb 17: Einpipettieren von Fibrinogen, Albumin (2%ig), Heparin, Protaminsulfat bzw. Fibrinogen, Globulin, Heparin, Protaminsulfat in Abständen von je 15 Sek.; Zugabe von Thrombin in einer Reihe sofort (*65*), in einer weiteren Reihe nach 1stündiger Inkubation der genannten Reaktionsteilnehmer (*66*). In Ansatz I nach 1 Stunde eher kürzere Reaktionszeiten (im Hinblick auf den inzwischen eingetretenen Aktivitätsverlust der Thrombinlösung), in Ansatz II Verlängerung der Reaktionszeit nach 1 Stunde gegenüber dem Ausgangswert

7. In-vivo-(Bilanz-)Versuche

Bei insgesamt 6 gesunden Versuchspersonen und 8 Hunden wurde Heparin und in wechselnden Abständen Protaminsulfat im Verhältnis 1 : 1 bis 1 : 5 (auf mg-Basis) injiziert.

Blutabnahme und Bestimmung der unter 1.—3. (S. 9—17) beschriebenen Reaktionszeiten. Der erwartete *Summations-* bzw. *Neutralisierungseffekt* zwischen den in-vivo- und in-vitro-Komponenten von Protaminsulfat und Heparin trat weder regelmäßig noch reproduzierbar auf.

C. Diskussion

Die *$CaCl_2$-Heparin*-Zeit nimmt mit steigender Heparinkonzentration zu (*1, 2*).

Dasselbe gilt für die *$CaCl_2$-Protamin*-Zeit (*4, 5, 6*). Die *Thromboplastin-Heparin*-Zeit nimmt mit steigender Heparinkonzentration zu (*7*). Das gilt sowohl für Blut, das mit Protaminsulfat (*8*) bzw. Heparin (*9*) *in vitro* angereichert worden war, als auch nach Heparin- bzw. Protamin*injektion* (*10, 11*).

Die *Thromboplastin-Protamin*-Zeit nimmt mit steigender Protaminkonzentration zu (*13*), besonders bei Verwendung protaminhaltigen Blutes bzw. Plasmas (additiver Effekt, *14*). Heparinzusatz in vitro wird durch steigende Protaminkonzentrationen zunehmend neutralisiert, so daß die Thromboplastin-Protamin-Zeiten zunächst kürzer und erst nach vollständiger Neutralisierung des Heparins durch Protaminsulfat länger werden (*15*). Das gilt sinngemäß auch für die Heparinisierung in vivo.

Die *Thrombin-Heparin*-Zeit von Blut bzw. Plasma nimmt mit steigender Heparinmenge in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration zu (*27—30*).

Die *Thrombin-Protamin*-Zeit nimmt im Plasma mit steigender Protaminkonzentration ab (*31*), auch bei Heparin- bzw. Protaminsulfatzusatz in vitro (*32, 33*). Bei Verkürzung einer durch *Heparin* verlängerten Reaktionszeit können sich Thrombin und Protaminsulfat ersetzen (*34—37*): Der *thrombinsparende Effekt des Protaminsulfates* ist direkt proportional der Thrombinmenge (Abb. 5).

Die *Thrombin-Protamin*-Zeit im *gereinigten System* nimmt mit steigender Protaminsulfat-Konzentration ab (*38, 39*); eine Verkürzung dieser Reaktionszeit *unterbleibt* aber, wenn Thrombinkonzentrationen gewählt werden, die Thrombin-Protamin-Zeiten von der Größenordnung der Plasma-Rekalzifizierungszeit ergeben (*43, 44*).

Als auffälligen Befund registrieren wir nach den vorstehenden Beobachtungen:

1. Im *Plasma nimmt die Rekalzifizierungszeit* mit *steigenden Protaminsulfat*-Konzentrationen ($CaCl_2$-Protamin-Zeit) *zu.*

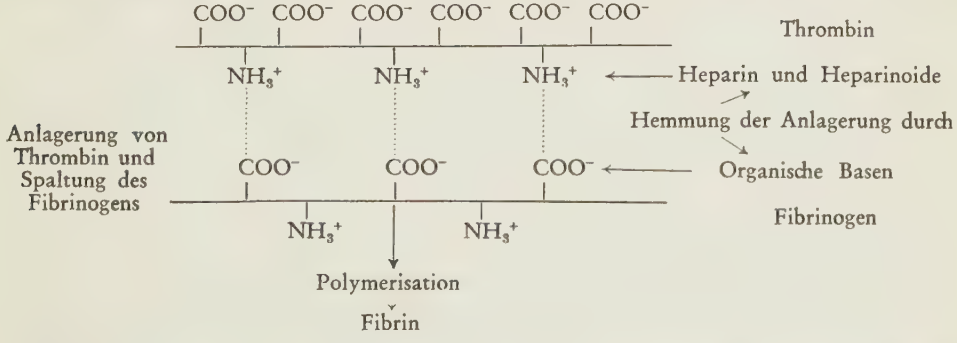
2. Im sog. *gereinigten System* (Thrombin-Fibrinogen) kommt es mit *steigenden Protamin*sulfat-Konzentrationen bis zu einer bestimmten Grenzkonzentration zunächst zu einer *Verkürzung der Thrombinzeit* (Thrombin-Protamin-Zeit). Bei Überschreiten dieser Grenzkonzentration tritt dann eine Verlängerung auf.

Auf Grund der Befunde unter (*49*) — (*51*) bzw. (*45*) — (*48*) entfallen als Erklärung hierfür Unterschiede der Fibrinogenkonzentration oder der Rekalzifizierung eigene Einflüsse; vielmehr ließ sich zeigen, daß die *Thrombinkonzentration hierfür entscheidend* ist (*43, 44*, im Gegensatz zu *40, 41*): Im Plasma ist in statu nascendi des Thrombins (s. hierzu auch 26) die *Reaktion* zwischen Thrombin und Protaminsulfat so verschoben, daß Protaminsulfatmengen, die im gereinigten System Thrombin-Fibrinogen den Ablauf dieser Reaktion noch fördern, im Plasma bereits als Hemmdosen wirken.

Auf das konzentrationsabhängige Verhalten der Reaktion Thrombin-Fibrinogen durch Protaminsulfat ist bereits durch F e r g u s o n (20) hingewiesen und dieser Effekt in folgender Weise gedeutet worden (25):

Thrombin lagert sich mit seinen positiv geladenen basischen Gruppen an die negativen Ladungen des Fibrinogens an. In dieser salzartigen Bindung entfaltet das Thrombin dann seine spezifische proteolytische Aktivität, die zur Abspaltung des Fibrinopeptids von Fibrinogen führt. Ist in dem Gerinnungssystem Heparin (+ Co-Faktor) vorhanden, so tritt Heparin infolge seiner im Vergleich zum Fibrinogen viel stärkeren negativen Ladung als kompetitiver Hemmkörper in Erscheinung, indem es einen Teil des Thrombins „abfängt". Setzt man dem Fibrinogen steigende Mengen einer organischen Base, z. B. Protamin, zu, so werden zunehmend mehr Karboxylgruppen des Fibrinogens durch diese blockiert und damit die Anlagerung des Thrombins an sein Substrat erschwert, was zu einer Verlängerung der Thrombinzeit führt*. Werden die Basen nur in geringerer Konzentration dem Fibrinogen zugesetzt, so werden nur wenige Karboxylgruppen des Fibrinogens blockiert, die Hemmung der Gerinnung ist nur geringfügig und wird offenbar überlagert von einer *Aktivierung des Thrombins*. Sind im System Fibrinogen — Thrombin die Basen in einer Konzentration zugegen, die nicht ausreicht, um einen Großteil der Karboxylgruppen des Fibrinogens zu blockieren, so wird die Anlagerung des Thrombins an sein Substrat nur mäßig erschwert. Da aber Thrombin ein etwas stärker saures Protein darstellt als Fibrinogen, dürfte seine Affinität zu den Basen größer sein als die des Fibrinogens. Es lagert sich also ein Teil der im Gerinnungsansatz vorhandenen freien Base an die Karboxylgruppen des Thrombins an, vermindert dessen elektronegative Ladung und erleichtert dadurch die Entstehung des Thrombin-Fibrinogen-Komplexes, der zur Spaltung des Fibrinogens nötig ist (Schema):

Für das Sichtbarwerden dieses als Thrombinaktivierung oder als Synergismus Thrombin-Protaminsulfat imponierenden Effektes muß nicht nur eine bestimmte



* Wir haben unter den von uns gewählten experimentellen Bedingungen allerdings stets nur Verkürzungen der Thrombinzeit registriert.

Thrombin*konzentration*, sondern auch eine bestimmte *Relation Thrombin-Protaminsulfat* gegeben sein.

Der konzentrationsabhängigen Aktivierung des Thrombins durch Protaminsulfat entspricht auch die *Beschleunigung der Fibrinbildung* im System Fibrinogen-Protamin-Thrombin *durch protamininkubiertes Thrombin* gegenüber dem Reaktionsverlauf ohne eine derartige Inkubation (*52a*). Auch Heparin wird unter diesen Bedingungen besser neutralisiert (*53a, b*).

Heparininkubiertes Fibrinogen ist für Thrombin und Protamin anfälliger als eine nicht inkubierte Mischung dieser Reaktionsteilnehmer (*54a*). Thrombin allein hingegen ergibt mit einem Fibrinogen-Heparin-Inkubationsgemisch längere Thrombinzeiten (*55b*). Damit entfällt auch die immerhin mögliche Annahme, daß Fibrinogen durch Heparin „labilisiert" würde. Man darf annehmen, daß infolge Inkubation mit Fibrinogen das *Heparin durch Protaminsulfat leichter zu neutralisieren* ist und die kürzeren Thrombinzeiten deshalb ermöglicht werden.

Eine Inkubationsmischung von *Fibrinogen und Protaminsulfat* ergibt längere Thrombinzeiten, als die nicht inkubierten Reaktionsteilnehmer hervorrufen (*56b*). Hier wäre in Analogie zu (*54*) an eine Inanspruchnahme, ein „Abziehen" des Protamins durch das Fibrinogen zu denken, so daß nur eine vergleichsweise geringere Aktivierung des Thrombins möglich ist. Das dürfte nach (*57*) auch für die Fähigkeit, Heparin zu neutralisieren, gelten.

Es wäre hier natürlich auch zu diskutieren, ob Fibrinogen durch Inkubation mit Protaminsulfat für Thrombin weniger anfällig wird; analoge Versuche mit einer 1%igen Streptomycinlösung (37) lassen dies u. E. aber als wenig wahrscheinlich erscheinen.

Die Thromboplastin-Zeit nimmt mit steigenden Protaminsulfatmengen zu (s. o.). Die Thromboplastin-Protamin-Zeiten entsprechen einander, ohne Rücksicht darauf, ob *Thromboplastin mit Protaminsulfat inkubiert* worden war oder nicht (*58*, IV und V).

Da eine entsprechende Verlängerung der Rekalzifizierungszeit in Parallelbestimmungen festzustellen war, muß allerdings zur Diskussion gestellt werden, inwieweit die Verlängerung der Thromboplastin-Zeit unter steigender Protaminsulfatkonzentration einer Antithromboplastin-Eigenschaft des Protaminsulfates (15, 20) und nicht lediglich einem — auf das Thromboplastin bezogen — unspezifischen Effekt entspricht. Auf diese Schwierigkeiten der Interpretation hat besonders M a t i s hingewiesen.

Inkubationseffekte zwischen *Thromboplastin und Heparin* fehlen desgleichen (*59*).

Der *Komplex Heparin-Protaminsulfat* kann sich in bezug auf die Heparin-Zeit (*3*), Thromboplastin-Heparin-Zeit (*12*), Thromboplastin-Protamin-Zeit (*18*)

indifferent verhalten. Dieses Verhalten ist, wie wir immer wieder gesehen haben, nicht die Regel, sondern setzt die *Erfassung der „richtigen" Relation zwischen Heparin und Protamin* voraus.

Für die Neutralisierung des Heparins durch Protamin in vitro wurde eine Relation von 1,5 : 1 (38, 39), für die Verhältnisse in vivo eine solche von 3 : 1 (39) bis 0,7 : 1 (40) angegeben. Allein diese Divergenz zeigt, daß verschiedene Gesichtspunkte in Betracht gezogen werden müssen, vor allem das Intervall zwischen Heparinapplikation und geplanter Neutralisierung, dann aber auch die Ausscheidungsverhältnisse (extrakorporaler Kreislauf, künstliche Niere!) und v. a. m. Zudem ist Protamin bzw. Protaminsulfat ein Überbegriff (Salmin, Clupein). Diese Protamine haben entweder in Abhängigkeit vom Molekulargewicht oder auf Grund chemischer Unterschiede ein *unterschiedliches Heparin-Neutralisationsvermögen.* Protaminlösungen sollten deshalb nicht mehr nach Prozenten, sondern nach Anti-Heparin-Einheiten deklariert werden, wobei eine Anti-Heparin-Einheit 1 Einheit Heparin neutralisiert. Das bei unseren Untersuchungen verwandte Protaminsulfat Roche, das mit Salmin identisch ist, neutralisiert 62 E Heparin; 1 mg Clupein hingegen neutralisiert 90 E des internationalen Heparinstandards. Der Unterschied zwischen diesen beiden Protaminen ist also erheblich (41).

Der *Komplex Heparin-Protamin* beeinflußt bei Protaminüberschuß im System Heparin-Protaminsulfat-Thrombin-Fibrinogen die Gerinnung gegenüber dem Leeransatz nicht (*60*). Die nach längerer Inkubationszeit — gegenüber dem Leeransatz — kürzeren Werte *(61)* sprechen entweder dafür, daß Thrombin durch überschüssiges Protaminsulfat bei längerer Einwirkungszeit aktiviert wird, oder daß Protamin seine Fähigkeit zur Thrombinaktivierung unter den gegebenen Voraussetzungen erst nach einigen Minuten erhält. Letztere Annahme erscheint wahrscheinlich, da Protamin auch im Ansatz (*60,* III), im Überschuß vorhanden, noch eine Verkürzung der Reaktionszeit gegenüber dem Ansatz *(60,* I) hätte erzielen lassen sollen.

Aus diesem Versuch ergibt sich der große Einfluß selbst *kleiner Zeitdifferenzen* überall da, wo es zur Komplexbildung zwischen den Reaktionsteilnehmern untereinander bzw. zwischen Reaktionsteilnehmern einerseits und Bluteiweißkörpern kommen kann.

In diesem Sinne spricht auch die Tatsache, daß sich die *$CaCl_2$-Heparin*-Zeit ganz verschieden verhält, je nachdem, *wann* das Protaminsulfat dem Plasma (vor längerer Zeit oder unmittelbar vor der Bestimmung) zugesetzt worden war.

Aus (*63*) und (*64*) ergibt sich, daß nach einstündiger *Inkubation mit Plasma* die Heparinneutralisierungsfähigkeit des Protaminsulfates vermindert ist*.

* Läßt man Protaminsulfat statt 1 Stunde 2 Stunden auf Plasma einwirken, so findet man unter Verwendung der gleichen Lösungen und desselben Plasmas, daß Heparin jetzt besser neutralisiert wird. Die Komplexbildung ist offenbar anderer Natur, als eine Stunde vorher. Die Verkürzung der Reaktionszeit im Ansatz II (*64*) gegenüber dem Ansatz II (*63*) ist durch inzwischen weiter fortgeschrittene Aktivierungsvorgänge bedingt. Dieser hier an sich störende Effekt ist bei Verwendung silikonisierter Glaswaren besonders deutlich zu beobachten. Hier sei auch erwähnt, daß ein weiterer Nachteil des Silikonisierens darin besteht, daß der Aktivitätsverlust sehr hochgradiger Heparinverdünnungen größer ist als im normalen Glasgefäß.

Dieses Verhalten des Plasmas scheint eher durch die Albuminkomponente bedingt zu sein, da im gereinigten System Albumin-Fibrinogen nach (*65*) die heparinneutralisierende bzw. thrombinaktivierende Wirkung des Protaminsulfates im Gegensatz zum Verhalten im gereinigten System Globulin-Fibrinogen nach einstündiger Inkubation zunimmt.

Die hier zusammengefaßt diskutierten Ergebnisse unserer Versuche könnten für die Interpretation von Gerinnungsanalysen im heparinhaltigen und/oder protaminhaltigen System auch unter den Bedingungen des extrakorporalen Kreislaufs von Interesse sein.

Ganz allgemein wird hier die Frage zu beantworten sein, ob eine vorgegebene Heparinmenge „optimal neutralisiert" ist, oder ob eine Gerinnungsstörung infolge unzureichender oder übermäßiger Protaminisierung vorliegt.

Einerlei, welche Reaktionszeit ermittelt wird, die Gerinnungsanalyse läuft immer darauf hinaus, die Einwirkung von Thrombin auf Fibrinogen zu messen. Man wird hierbei eine mögliche Interferenz überschüssigen *Heparins* oder *Protamins* bzw. eines Heparin-Protamin-*Komplexes* mit der *Reaktion* Thrombin-Fibrinogen, bzw. *Inkubationseffekte* dieser Reaktionsteilnehmer *untereinander* in Betracht zu ziehen haben.

Über die hierbei entstehenden Komplexe und ihre koagulotropen Effekte liegen u. W. keine ausreichenden experimentellen Untersuchungen vor. Unsere in-vitro-Untersuchungen deuten aber darauf hin, daß es innerhalb kurzer Zeit zur „Umschichtung" bzw. Freisetzung von Protaminsulfat bzw. Heparin kommen kann. So dürfte das als *Heparin-Rebound* bekannte Phänomen (42, 43) in vielen Fällen mit diesen Vorgängen im Zusammenhang stehen. Die Annahme, daß Heparin infolge schnellerer Ausscheidung des Protamins aus dem Heparin-Protamin-Komplex freigesetzt würde (44), kann zur Erklärung unserer in-vitro-Beobachtungen nicht herangezogen werden*.

Sicher ist, daß alle Gerinnungsanalysen im Hinblick auf den oben erwähnten Einfluß selbst kleiner *Zeit*differenzen bei der Komplexbildung in vitro und in vivo immer nur Aussagen für den Zeitpunkt der Untersuchung gestatten.

Zur Erfassung des *Protaminbedarfs* für eine Heparinneutralisierung scheint uns die sog. Protamintitration (45, 46) die zweckmäßigste Methode zu sein. Bei ausreichender Abstufung der Protaminkonzentration läßt sich der für die Neutralisierung des Heparins erforderliche Protaminbedarf auch nach eigenen experimentellen Beobachtungen mit großer Annäherung ermitteln. Das würde

---

* Matis konnte in unveröffentlichten Untersuchungen (52) feststellen, daß die nephelometrisch zu registrierende Trübung in einem Heparin-Protamin-Gemisch auch unter konstanten Bedingungen weder hinsichtlich ihres zeitlichen Auftretens noch ihrer Intensität voll reproduzierbar ist. Es muß unter diesen Umständen damit gerechnet werden, daß einzelne der von uns beobachteten Inkubationseffekte auch einer anderen Deutung zugänglich sind.

mutatis mutandis auch für die Erfassung eines etwaigen Protaminüberschusses auf dem Wege einer Heparintitration gelten.

Einige Möglichkeiten der Beeinflussung häufig verwandter Reaktionszeiten durch Protamin oder Heparin haben wir in unseren Versuchen gezeigt. Die Abstufung der jeweils in vitro zugeführten Heparin- bzw. Protaminmenge war allerdings zu grob, als daß die ermittelten Reaktionszeiten als Heparin- bzw. Protamintitration* zu werten gewesen wären.

Wenn im Interesse praktisch-klinischer Notwendigkeiten *kurze Reaktionszeiten* erwünscht sind und eine Protamintitration deshalb in bestimmten Situationen unzweckmäßig erscheinen könnte, so würden sich nach unseren Erfahrungen im Hinblick auf störende Inkubationseffekte, ganz abgesehen von methodischen Erwägungen (51), *Thromboplastinzeiten* eher eignen, als die häufig verwandte Thrombinzeit. Diese Aussage stützt sich jedoch nur auf in-vitro-Versuche und kann nicht durch klinische oder experimentelle Erfahrungen mit dem extrakorporalen Kreislauf erhärtet werden.

Abschließend sei auf eine Reihe von Experimenten (sog. Bilanzversuche) hingewiesen: Wir haben hier nach Injektion einer bestimmten Menge von Protaminsulfat und/oder Heparin aus dem Verhalten der vorstehend besprochenen Reaktionszeiten die injizierten Heparin- bzw. Protaminmengen zu berechnen versucht. Über verhältnismäßig grobe Annäherungen sind wir hierbei allerdings nicht hinausgekommen.

So war nach Injektion von Heparin und Protamin im Verhältnis 1 : 2 im Abstand von 5—10 Min. ein anderes Ergebnis etwa der *$CaCl_2$-Protamin-Zeit* oder *Thrombin-Protamin-Zeit* zu erwarten, als nach Injektion von Heparin und Protamin im Verhältnis 1 : 5. Die Reaktionszeiten unterschieden sich: Bei 6 Versuchen war aber nur 3mal ein *Summationseffekt* von überschüssigem Protaminsulfat nach Injektion im Verhältnis 1 : 5 und dem in vitro zugegebenen Protaminsulfat zu registrieren. Wurde der in-vivo-Anteil des Protaminsulfats, der sich verhältnismäßig gut abschätzen ließ, durch einen entsprechenden in-vitro-Zusatz von Protaminsulfat ersetzt, so ergaben sich überraschend große Differenzen. Wir haben diese Versuche im Hinblick auf die sehr große Unzuverlässigkeit abgebrochen und sie auch in diese Darstellung hier nicht einbezogen.

* Während der „undifferenzierten" Bestimmung des sog. (s. hierzu auch 35) Heparintoleranztestes nach Marbet und Winterstein (47) der Protamintoleranztest nach Beller und Steichele (48) gegenüberzustellen wäre, entsprächen der „Protamintitration" die zahlreichen Modifikationen des Heparintoleranztestes in vitro (49, 50).

D. Zusammenfassung

1. Beschreibung der *Beeinflussung von Reaktionszeiten* der angegebenen Methodik *durch Protaminsulfat bzw. Heparin.*

2. Hinweis auf die *konzentrationsabhängige Beeinflussung der Thrombinzeit* bzw. der Reaktion Fibrinogen-Thrombin durch Protaminsulfat. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei unter den besonderen Bedingungen der jeweiligen Gerinnungsanalyse die Relation Thrombin-Protamin.

3. *Inkubationsversuche* lassen *Wechselbeziehungen* zwischen Thrombin und Protaminsulfat besonders deutlich werden, nicht hingegen einen Antithromboplastineffekt des Protamins.

4. In den gewählten Systemen auftretende *Komplexe* erwiesen sich als unstabil, wobei der Albumin-Komponente besondere Bedeutung zukommen dürfte.

5. Diskussion der möglichen praktischen *Bedeutung* der Versuchsergebnisse *für die Gerinnungsanalyse im Zusammenhang mit der extrakorporalen Zirkulation;* Hinweis auf den Zeitfaktor.

E. Literatur

(1) Naegeli, Th., P. Matis, R. Gross, H. Runge, W. Sachs: Die thromboembolischen Erkrankungen. 2. Aufl. Schattauer, Stuttgart 1960.

(2) Chargaff, E., K. B. Olson: J. biol. Chem. **122:** 135 (1937) und **123:** 153 (1938).

(3) Jorpes, E., P. Edmann, T. Thanning: Lancet **22:** 975 (1934).

(4) Fischer, A.: Biochem. Z. **278/279:** 133, 134 (1935).

(5) Jorpes, J. E.: Heparin in the Treatment of Thrombosis. 2nd Ed. Oxford Medical Public., Oxford Univ. Press, London 1946.

(6) Winterstein, A.: Thromb. Diath. haem. **II:** 431, 433, 429 (1958).

(7) Winterstein, A.: Erg. Bluttransfusionsf. Bibl. haemat. (Basel) **11:** 35 (1960).

(8) Miescher, P., A. Kossel: Zit. W. H. Thompson: Z. physiol. Chem. **29:** 1 (1900).

(9) Thompson, W. H.: Z. physiol. Chem. **29:** 1 (1900).

(10) Beller, F. K., W. Krauss: Gynaecologica **140:** 273 (1955).

(10a) Beller, F. K., M. Naegele: Arch. Gynäk. **188:** 123 (1956).

(11) Kossel, H.: Z. Hyg. Infekt.-Kr. **27:** 44 (1900).

(12) Jaques, L. B.: Brit. J. Pharmacol. **4:** 135 (1949).

(13) Hurt, R., H. Perkins et al.: J. thorac. Surg. (1956).

(14) Chargaff, E.: J. biol. Chem. **125:** 661, 671 (1938).

(15) Marbet, R., A. Studer, A. Winterstein: In: Thrombose und Embolie, S. 362. Schwabe, Basel 1955.

(16) Shafir, E., et al.: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **50:** 300 (1942).

(17) Hougie, C.: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **98:** 130 (1958)

(18) Shanberge, J. N., A. Barlas, E. E. Regan: J. Lab. clin. Med. **52:** 744 (1958).

(19) Tocantins, L.: Coagulation of Blood. Grune & Stratton, New York-London 1955.

(20) Ferguson, J. H.: Amer. J. Physiol. **130:** 759 (1940).

(21) Fantl, P., B. A. Everard: Austr. J. exp. Biol. med. Sci. **28:** 253 (1950).

(22) Shelley, W. B., M. P. Hodgkins, N. B. Visscher: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **50:** 300 (1942).

(23) Mylon, E., M. C. Winternitz, G. J. du Suto-Nagy: J. biol. Chem. **143:** 21 (1942).

(24) Witte, S., P. Dirnberger: Klin. Wschr. 1952: 997.

(25) Amann, R., und E. Werle: Klin. Wschr. 1958: 22.

(26) Matis, P.: Habilitationsschrift, Tübingen 1958.

(27) Matis, P.: Arzneimittel-Forsch. **3:** 613 (1953).

(28) Hartert, H.: Schweiz. med. Wschr. 1954: 831.

(29) Matis, P., K. Bauer, Ch. Rockstroh: Med. Welt 1950: 1520.

(30) Matis, P.: In: Thrombose und Embolie. S. 853. Schwabe, Basel 1955.

(31) Grießer, G.: Habilitationsschrift, Tübingen 1959.

(32) Grießer, G., P. Matis: Thoraxchir. 8: 284 (1960).

(33) Gross, R., R. Holemanns: Klin. Wschr. 1960: 999.

(34) Jürgens, J., F. K. Beller: Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse. Thieme, Stuttgart 1959.

(35) Nagel, W., W. Mayer, P. Matis: Arzneimittel-Forsch. 10: 99 (1960).

(36) Gross, R., J. Heurer, K. Solth: Acta haemat. (Basel) 16: 147 (1956).

(37) Ross, A.: Pers. Mitt.

(38) Deutsch, E.: Blutgerinnungsfaktoren. Deuticke, Wien. 1955, und: Die Blutgerinnung. In: (1).

(39) Jaques, L. B.: Biochem. J. 37: 189 (1943).

(40) Perlick, E.: Antikoagulantien. VEB Thieme, Leipzig 1960.

(41) Winterstein, A.: Pers. Mitt.

(42) Dodrill, F. D., N. Marshall, J. Nyboer, C. H. Hughes, A. J. Derbyshire, A. B. Stearns: J. thorax. Surg. 33: 60 (1957).

(43) Effler, D. B., W. J. Kolff, L. K. Groves, F. Mason Sones: J. thorax. Surg. 32: 620 (1956).

(44) Beer, R., G. Loeschke: Anaesthesist 8: 70 (1959).

(45) Allen, J. G., P. V. Moulder, R. E. Elghammer, B. J. Grossman, G. L. McKen, M. H. Sanderson, W. Egner, J. M. Crosbie: J. Lab. Clin. Med. 34: 473 (1949).

(46) Perkins, H., J. J. Osborn, R. Hurt, F. Gerbode: J. Lab. clin. Med. 48: 233 (1956).

(47) Marbet, R., A. Winterstein: Ärztl. Forsch. I: 460 (1955).

(48) Beller, F. K., D. Steichele: Arch. Gynäk. 188: 411 (1957) u. Z. ges. exp. Med. 128: 458 (1957).

(49) Soulier, J. P., A. Le Bolloch: Rev. Hémat. 5: 148 (1950) u. Sang. 22: 122 (1951).

(50) Matis, P., W. Mayer, F. Mörl: Zbl. Chir. 82: 599 (1957).

(51) Hiepler, E.: Arzneimittelforschung 9: 763 (1959).

(52) Matis, P.: Pers. Mitt.

Lebenslauf

Am 2. Juni 1934 wurde ich, Rosemarie Charlotte Hinger, in Tübingen als Tochter des Ehepaares Karl und Anna Hinger-Duffner geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Bieringen a. N. vom März 1940 bis März 1948, da infolge der Kriegsereignisse der Besuch einer höheren Schule nicht möglich war; die höhere Schule ab September 1948 in Schwenningen a. N., Ochsenhausen, Krs. Biberach, und Tübingen.

Am 15. März 1954 legte ich in Tübingen am neusprachlichen Wildermuth-Gymnasium die Reifeprüfung ab. Im Anschluß daran studierte ich in Tübingen bis zur ärztlichen Vorprüfung im April 1957 Medizin. Das klinische Studium ab Sommersemester 1957 absolvierte ich in Innsbruck, Göttingen, Berlin und Tübingen. Im Dezember 1960 legte ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen das Medizinische Staatsexamen ab.

An meiner im Mai 1960 abgeschlossenen Dissertation hatte ich vom Herbst 1958 an in den Laboratorien der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen gearbeitet. Meine Ausbildung als Medizinalassistentin begann ich am 1. Januar 1961 in der Naturheilklinik St. Uli in Murnau (Obb.). Von dort wechselte ich zur Chirurgischen Abteilung des St.-Marien-Hospitals in Wesel am Niederrhein über. Seit 15. Oktober 1961 bin ich nun auf der Geburtshilflich-Gynäkologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Griesbach im Rottal (Ndb.) tätig.

Allen meinen akademischen Lehrern schulde ich vielen Dank, besonders Herrn Prof. Dr. Walter Dick, mit dessen Einverständnis mir das Thema dieser Arbeit gegeben worden war.

Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Herrn Dozent Dr. Paul Matis für seine wertvolle Diskussion und seinen mir jederzeit gütig gewährten Rat, ebenfalls Herrn Dr. Wolfgang Mayer für seine freundliche Unterstützung, meinen besten Dank aussprechen.